

Kinesisk malurt

– en medicinplante med potentiale

Bioaktive stoffer fra planten kinesisk malurt anvendes i dag med stor succes til malariabehandling verden over. Stofferne har dog mange andre mulige anvendelsesområder, fx som et alternativ til brugen af antibiotika i fjerkræproduktion.

Planten kinesisk malurt (*Artemisia annua*) er en éttårig plante, der kan blive op til 4 m høj, med meget tynde og fine bregne-lignende blade. Den har været anvendt som medicinplante i Kina i flere tusinde år mod malaria og andre lignende febersygdomme.

I 1970'erne lykkedes det kinesiske forskere at isolere det primære bioaktive stof i planten, artemisinin. Siden er interessen for planten kun vokset, idet artemisinin har vist sig at være det mest effektive lægemiddel identificeret til dato mod parasitter af arten *Plasmodium*, der er skyld i malaria.

Stofferne fra planten har dog mange andre spændende mulige anvendelsesområder. I USA er der således lavet forsøg, der viser, at artemisinin og afledte stoffer selektivt kan dræbe kræftceller. Spanske forskere har for nylig fundet, at stoffer afledt af artemisinin kan bruges i behandling af smitsom leverbetændelse (hepatitis A og B). Vi har været involveret i et dansk forskningsprojekt, der bl.a. har

undersøgt mulighederne for at bruge planten som et alternativ til visse antibiotika og midler til parasitkontrol i produktionen af fjerkræ.

Kemien i kinesisk malurt

Kinesisk malurt er en plante med en udpræget skarp og aromatisk lugt. Lugten skyldes den æteriske olie i planten, der hovedsagligt består af såkaldte mono- og sesquiterpener. Terpener er flygtige og almindeligt kendt som den primære stofgruppe i æteriske olier. Der er identificeret lidt over 270 forskellige komponenter fra den æteriske olie i kinesisk malurt, bl.a. kamfer. Kompositionen af den æteriske olie kan variere meget i forhold til hvilken variant af planten, der dyrkes, hvornår der høstes og ikke mindst, hvilke betingelser planten dyrkes under.

Som nævnt er kinesisk malurt mest kendt for sit indhold af stoffet artemisinin, der er en såkaldt sesquiterpenlaktone. En meget vigtig del af struktu-

Om forfatterne

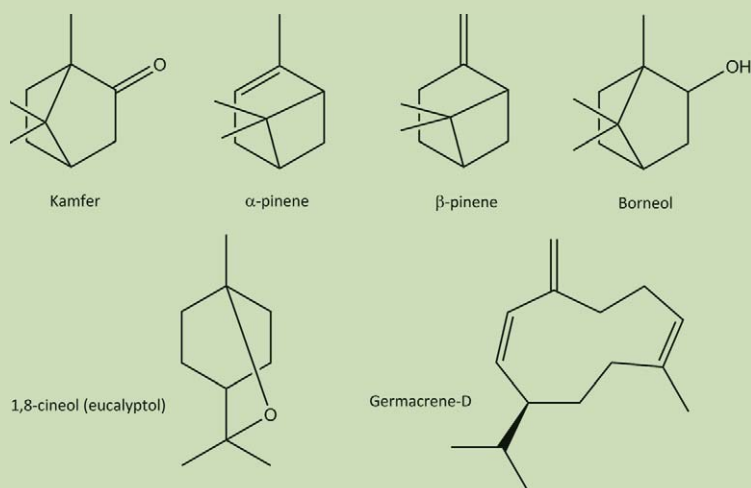


Xavier Fretté
xafr@kbm.sdu.dk

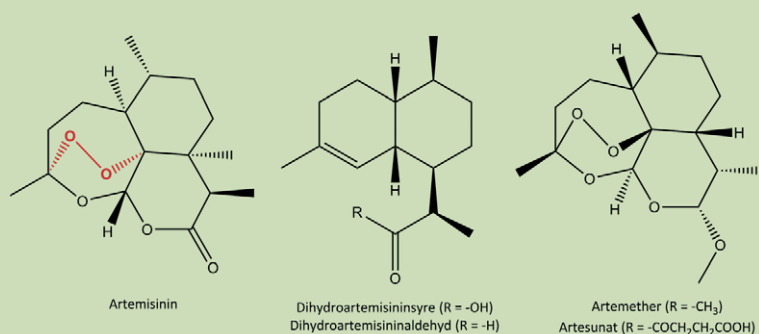


Kathrine Bisgaard Christensen
kbch@kbm.sdu.dk

Begge ved Inst. for Kemi-, Bio- og Miljøteknologi, Det Tekniske Fakultet, Syddansk Universitet



Kemiske strukturer af de primære mono- og sesquiterpener identificeret fra kinesisk malurt.



Kemiske strukturer af artemisinin og lignende stoffer fra kinesisk malurt samt de semisyntetiske derivater artemether og artesunat.

ren for artemisinin er den interne peroxidgruppe (C-O-O-C), som er helt essentiel for stoffets mange biologiske aktiviteter. Endvidere indeholder planten mange stoffer, der er afledt af artemisinin samt stoffer, der kan betegnes som forstadier til artemisinin i den biologiske syntese af stoffet. Indtil videre er der identificeret ca. 40 sådanne stoffer.

Artemisinin kan fremstilles syntetisk ved organisk syntese, men processen er ikke indtil videre rentabel. Derfor foregår produktionen stadig primært ved dyrkning af kinesisk malurt med efterfølgende ekstraktion og oprensning af artemisinin.

I kinesisk malurt er der også identificeret en lang række andre stoffer tilhørende stofgrupper som fenolske syrer, coumariner og flavonoider, der er meget almindelige at finde i alle typer af planter. Der er således rigtig mange forskellige kemiske stoffer i en plante, og det kan derfor være en større udfordring at identificere og oprense ét bestemt.

Den biologiske aktivitet

Den interne peroxidgruppe i artemisinin anses for at være afgørende for, at stoffet virker mod malariparasitter. Afledte stoffer af artemisinin, som ikke har denne peroxidgruppe, udviser nemlig ikke aktivitet mod malaria. Selvom man endnu ikke kender den præcise virkningsmekanisme, er det dog sandsynligt, at peroxidgruppen reagerer med jernet i hæmoglobins hæm-gruppe og efterfølgende danner frie radikaler og andre reaktive molekyler, herunder hydroxylradikaler (OH[•]) og superoxid anion (O₂^{•-}). Disse reaktive molekyler kan oxidere fedtstoffer og

Dyrkning af kinesisk malurt

Kinesisk malurt dyrkes verden over men primært i Kina og Vietnam, der står for ca. 70 % af markedet, og i Østafrika, der står for ca. 20 %. Beregninger fra 2009 vurderer, at der årligt produceres 140-180 ton artemisinin, som dog knap kan dække den stigende efterspørgsel. Indholdet af artemisinin i kinesisk malurt er meget lavt (0,01-1,4 % tørvægt), så ethvert tiltag, der kan øge mængden i planten, har både stor økonomisk og sundhedsmæssig betydning.

Man ved, at faktorer som sort, klima, gødningsniveau og høsttidspunkt kan have stor effekt på produktionen af plantens sekundære metabolitter heriblandt den æteriske olie, fenolske komponenter osv. Ligeledes kan behandlingen af plantematerialet efter høst og den måde, det ekstraheres på, påvirke udbyttet af et ønsket stof signifikant.

Seniorforsker Kai Greisen ved Aarhus Universitet har i et forsøg med to nøje udvalgte sorter af kinesisk malurt vist, at planten sagtens kan dyrkes under vores klimaforhold og give et rigtig fint udbytte. Artemisinin-indholdet i tørrede blade var 1,3 – 1,5 % for de to arter og det teoretiske



andre komponenter i parasitternes membraner, så membranen går i stykker og dermed slås de ihjel.

Ud over artemisinin findes der stoffer på markedet, der er lavet ved kemiske modifikationer af naturligt oprenset artemisinin. Disse stoffer indeholder også peroxidgruppen, og mange er faktisk mere effektive end artemisinin. Malaria-patienter, der får den af WHO anbefalede kombinationsbehandling for malaria på syv dage, bliver helt fri for *Plasmodium*-parasitten.

Artemisinin og afledte stoffer med intern peroxid-gruppe har også vist sig at kunne slå kræftceller ihjel, og man mener, at virkningsmekanismen grundlæggende er den samme. Fordi cancerceller deler sig så hurtigt, har de et højere jernindhold end normale celler, da jern bruges i forbindelse med kopiering af DNA. Derfor er kræftceller mere følsomme overfor artemisinin end kroppens normale celler.

Æteriske olier er kendt for at virke antimikrobielt. Fx kan man tilsætte krydderurter som timian eller rosmarin til fødevarer for at begrænse væksten af bakterier og skimmelsvampe og på den måde forlænge fødevarernes holdbarhed.

I forsøg med celler i reagensglas er det blevet vist, at kamfer hæmmer væksten af bakterien *Streptococcus aureus*. Derfor kan man forvente, at kinesisk malurt, som bl.a. indeholder kamfer, også vil vise denne antibakterielle aktivitet. Man har da også kunnet vise, at ekstrakter af kinesisk malurt i forskellig grad har antimikrobielle aktiviteter. Forsø-



Kinesisk malurt (*Artemisia annua*). Planten er også kendt under navne som kinesisk bynke eller étårig bynke og er beslægtet med bl.a. gråbynke (*A. vulgaris*), have-malurt (*A. absinthium*) og estragon (*A. dracunculus*). Oprindeligt stammer planten fra det nordlige Kina og Mongoliet. Det kinesiske navn er Qing Hao, som betyder grøn urt.

Brugen af "artemisininer" i Danmark

Artemisinin og stoffer afledt heraf er i dag et af de mest effektive våben mod malaria, vi kender. Stofferne anvendes i flere lægemidler mod malaria. I Danmark er der dog pt. kun et enkelt godkendt lægemiddel (Eurartesim), som indeholder et derivat (dvs. et afledt stof) af artemisinin. Det blev godkendt i 2011.

Når artemisinin-baserede præparater anvendes til behandling af malaria, bruges de som hovedregel i kombination med et andet lægemiddel, primært for at undgå udvikling af resistente malariaparasitter. Denne behandlingsform kaldes for ACT (Artemisinin Combined Therapy) og anbefales af Verdenssundhedsorganisation WHO.

udbytte op til 60 kg artemisinin pr. hektar. Til sammenligning er artemisinin-indholdet i planter dyrket i Vietnam under 0,7 % tørvægt og det teoretiske udbytte ca. 20 kg pr. hektar. På grund af tab ved ekstraktion og oprensning får man dog kun 7,5 kg ud pr. hektar.

Da kinesisk malurt bruger artemisinin som et slags forsvarstof har ph.d.-studerende Anders Kjær samt seniorforsker Martin Jensen fra Aarhus Universitet også undersøgt, om man ved at stresse planten kemisk eller fysisk kan lokke den til at producere mere af stoffet. Det viste sig desværre ikke muligt, formentlig pga. planternes alder.

Til gengæld kan tørringen af plantematerialet før det ekstraheres i høj grad påvirke indholdet af artemisinin. Et forsøg har således vist, at tørring i sollys omdanner 94 % af dihydroartemisininsyren (der er en forløber for artemisinin) i planten til netop artemisinin. Det stemmer fint overens med, at man i Vietnam lader planten tørre udendørs, inden den ekstraheres.

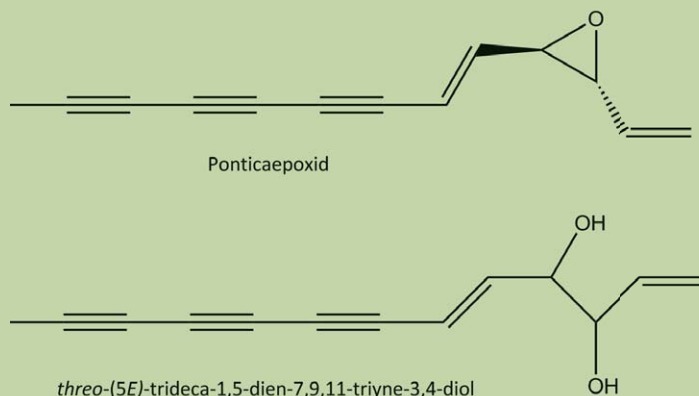
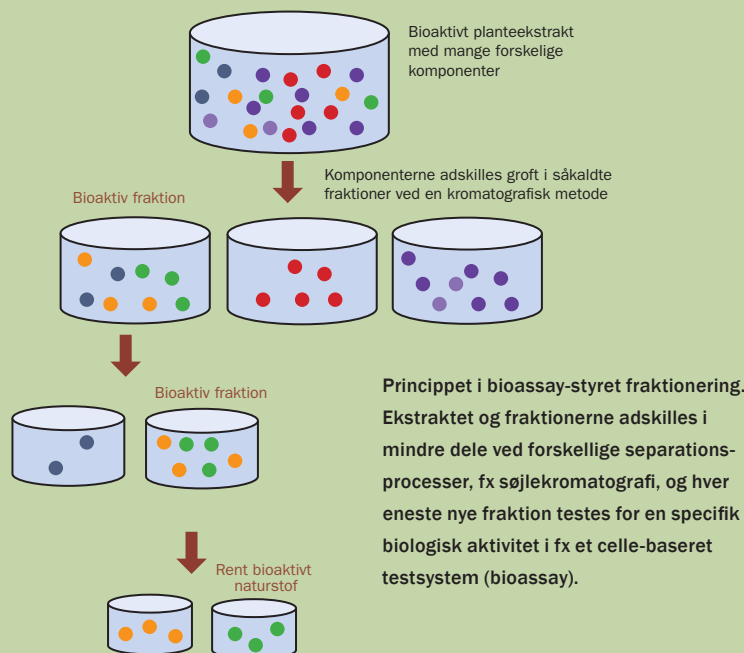
En ældgammel opskrift

Anvendelsen af kinesisk malurt (*Artemisia annua*) som medicinalplante er så vidt vides beskrevet første gang i nogle gamle skrifter fra 168 f.Kr., som blev fundet i en arkæologisk udgravning i Kina. I teksterne var der over 200 forskellige opskrifter på traditionelle plante-baserede medicinske præparater mod malaria og andre lignende sygdomme.

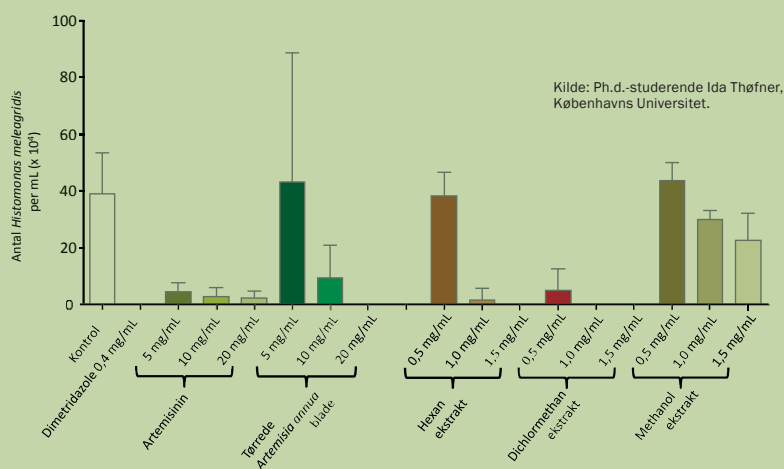
Under Vietnamkrigen i begyndelsen af 1960'erne påbegyndte den kinesiske hær et projekt med det formål at finde et middel mod malaria, da de gerne ville være mere resistente over for sygdommen end amerikanerne. Forskere gik i gang med at afprøve opskrifterne fra de gamle skrifter, og i 1971 fandt de én, der var effektiv mod malariaparasitter: Te lavet på blade fra *Artemisia annua*. Dette medførte, at man fik isoleret det primære bioaktive stof artemisinin, og derefter blev det første kliniske studium med artemisinin udført i Kina i 1979. Kinesisk malurt og dens indholdsstoffer blev hurtigt udbredt til resten af verden, der også efterspurgte midler til bekæmpelse af malaria. Tidligere havde man anvendt naturstoffet kinin (quinin), der er udvundet fra barken på Kinastræet. Men 2. Verdenskrig satte en stopper for adgangen til råstofferne, der primært kom fra Indonesien.



Gamle skrifter fra 168 f.Kr.



Kemiske strukturer for de to polyacetylen, der er identificeret fra *Artemisia annua*.



Antal celler af parasitten (*Histomonas meleagridis*) i en celle-baseret test med forskellige koncentrationer af stof og ekstrakt. Fra venstre viser diagrammet: Ingen tilsætning (kontrol), det tidligere anvendte lægemiddel mod *H. meleagridis* (dimetridazole), artemisinin, hexan-, dichlormetan- og metanol-ekstrakt af *Artemisia annua* i forskellige koncentrationer.

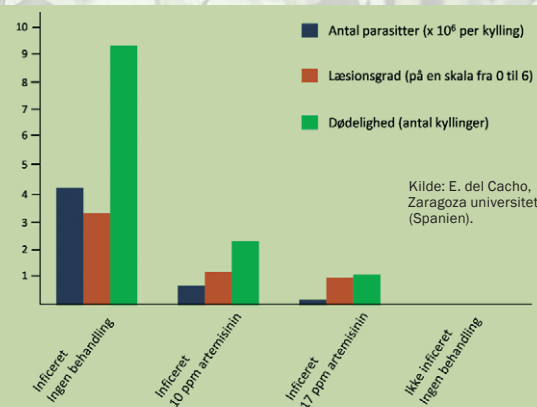
gene har dog ofte ikke identificeret de specifikke komponenter, der er årsag til den observerede aktivitet – så man kan altså ikke konkludere, at det netop er kamfer, der er årsagen.

Fjerkræ og kinesisk malurt

At kinesisk malurt indeholder stoffer, der kan bekæmpe både bakterier og parasitter, var baggrunden for et dansk forskningsprojekt, der blev sat i gang for fem år siden i et samarbejde mellem forskergrupper fra Syddansk Universitet, Aarhus Universitet, Københavns Universitet samt DHI, finansieret af Det Strategiske Forskningsråd.

Projektet gik ud på at undersøge, om man kan forhindre alvorlige parasit- og bakteriefremkaldte sygdomme hos fjerkræ ved at tilsætte tørrede blade eller ekstrakter af kinesisk malurt til foderet. Sygdommene coccidiose og nekrotiserende enteritis forårsager store tab og dyrevelfærdsproblemer i opdræt af høns og kyllinger, mens sygdommen blackhead er en frygtet sygdom med høj dødelighed indenfor opdræt af kalkuner. Sædvanligvis behandles disse sygdomme med antibiotika eller antiparasitære midler, men det giver problemer med udvikling af mikrobiel resistens, når der anvendes fx antibiotika. Der findes faktisk i øjeblikket ingen godkendt behandlingsmulighed for blackhead, mens behandlingsmulighederne for de to andre sygdomme er truet af et muligt forbud pga. en ændring i europæisk lovgivning. Derfor er der stor interesse for at finde alternative behandlingsmuligheder.

Nekrotiserende enteritis skyldes bakterien *Clostridium perfringens* mens parasitter er årsag til coccidiose og blackhead. De skyldige parasitter er hhv. arter af parasitslægten *Eimeria* og *Histomonas meleagridis*, som begge er tæt beslægtet med malaria-parasitten *Plasmodium falciparum*. Derfor er der grund til at antage at artemisinin og artemisininlignende stoffer også vil virke mod disse sygdomsfremkaldende mikroorganismer.



Effekt af behandling med artemisinin på antal af parasitter, dødelighed og læsionsgrad i tarmen hos kyllinger inficeret med parasitten *Eimeria tenella*.

Celleforsøg viser effekt

For at afgøre, om kinesisk malurt har en effekt på de ovennævnte bakterier og parasitter, blev der i første omgang lavet ekstrakter af planten, som blev testet på celler af bakterier og parasitter. Ekstrakterne blev lavet af ph.d. studerende Elise Ivarsen fra Syddansk Universitet ud fra opløsningsmidlerne hexan, metanol og dichlormetan. Hermed opnår man, at stofferne i planten ekstraheres i tre overordnede grupper efter polaritet – dvs. om de er fedt- eller vandopløselige. Det giver et første fingerpeg om, hvad det er for en type stoffer, der har en effekt på mikroorganismerne.

Ved at bruge en oprensningsprocedure kaldet bioassay-styret fraktionering er det desuden muligt at identificere og karakterisere enkelte bioaktive stoffer fra de komplekse ekstrakter. De identificerede stoffer kan så også testes enkeltvis på de sygdomsfremkaldende mikroorganismer.

I celleforsøgene med bakterier, udført af lektor Ricarda Engberg fra Aarhus Universitet, viste både hexan- og dichlormetan-ekstrakterne aktivitet overfor bakterien *C. perfringens* ved koncentrationer på hhv. 170 og 270 ppm. Fra hexan-ekstraktet lykkedes det bl.a. at identificere stoffet ponticaepoxid, en såkaldt polyacetylen, der viste aktivitet ved 200 ppm. Mod forventning viste kamfer ingen aktivitet mod *C. perfringens* i koncentrationer helt op til 1.600 ppm, selvom stoffet er kendt for sin antimikrobielle aktivitet.

Ved celleforsøg med Blackhead-parasitten *H. meleagridis*, udført af ph.d. studerende Ida Thøfner fra København Universitet, var det igen hexan- og dichlormetan-ekstrakterne, der udviste aktivitet. Dichlormetan-ekstraktet var faktisk mere effektivt end ren artemisinin. Det skal dog bemærkes, at selvom artemisinin er aktiv mod *H. meleagridis*, er det ikke lige så aktivt som det nu forbudte præparat (dimetridazole), der tidligere blev anvendt mod parasitten.

Artemisinin i stedet for antibiotika?

Cellebaserede forsøg kan selvfølgelig ikke stå alene – det afgørende er at afgøre, om stofferne også virker på mikroorganismerne i levende kyllinger og høns. Den første udfordring var her at få kyllingerne til at æde foder med ekstrakter af kinesisk malurt, da artemisinin er ekstremt bittert og ekstrakterne har en kraftig aromatisk duft. Fordringsforsøg med raske dyr udført af Ricarda Engberg fra Aarhus Universitet viste da også, at kyllinger ikke kan klare et for højt indhold af kinesisk malurt i foderet. Grænsen for tilsætning ligger ved 200 mg pr. kg foder, et højere indhold betød, at kyllingerne tabte vægt under forsøgene.

Det viste sig, at tilsætningen af hexan-ekstraktet i foderet til kyllinger inficeret med *C. perfringens* havde en effekt på denne bakterie, da både antallet af bakterier i dyrenes tarmsystem og de læsioner, som bakterierne giver anledning til, var reduceret.

I de tilsvarende forsøg med kyllinger inficeret med coccidiose-parasitter, udført af Ida Thøfner fra København Universitet, blev det vist, at tilsætning af enten rent artemisinin eller dichlormetan-ekstraktet af kinesisk malurt, som har et højt indhold af artemisinin, gav anledning til en betydelig reduktion af parasitforårsagede læsioner i blindtarmen hos kyllingerne. Lignende forsøg udført med artemisinin i Spanien viser samme resultater. Selvom resultater fra begge fordringsforsøg med kyllinger ser lovende ud, var det dog ikke muligt med de givne behandlinger at gøre alle kyllingerne bakterie- eller parasitfri eller at fjerne symptomerne helt.

Før bekæmpelsen af bakterier og parasitter i kyllingeopdræt ved hjælp af kinesisk malurt kan blive virkelighed må der derfor mange flere forsøg til. Både for at kunne identificere og karakterisere de komponenter i planten, der er ansvarlige for den biologiske aktivitet og for at finde ud af, hvilke udtræk af planten der er de mest optimale som tilsætning til foderet. Fremtidige forskningsprojekter vil forhåbentligt afklare dette. ■

Yderligere læsning

Artemisinin – et effektivt lægemiddel mod malaria udvundet fra en kinesisk medicinplante, kap. 7 i BIOTEK 2 Anvendt bioteknologi (2012) K. Overgaard og S.G. Sommer (redaktører), L&R Uddannelse

Læs mere om projektet om fjerkræ og kinesisk malurt på hjemmesiden: www.artemisiaprojekt.dk

Produktion af artemisinin

Storskalaproduktion af artemisinin foregår primært i Kina og Vietnam. Ekstraktionen af artemisinin fra plantematerialet kan foregå med opløsningsmidler som dichlormethan eller hexan. Da hexan er billigere end dichlormethan bruger man oftest hexan, som også er nemt at fordampe. Plantematerialet behøver ikke at blive forarbejdet inden ekstraktionen, da artemisinin findes i små blærer (trichomer) på bladens yderside og dermed er lettilgængeligt.



Artemisia annua

Trichomer

Artemisinin

Ekstraktionen gentages tre gange, og efter hvert trin fjernes opløsningsmidlet ved destillation, således at det kan genbruges. Artemisinin oprenses herefter ved en række

processer såsom søjlekromatografi og krystallisation, og efter en sidste tørringsproces er de hvide krystaller klar til anvendelse.